

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-332556

(43) 公開日 平成11年(1999)12月7日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
			E
A 0 1 N 63/00		A 0 1 N 63/00	F
63/02		63/02	E
// (C 1 2 N 1/20			
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平10-150362	(71) 出願人	591014710 千葉県 千葉県千葉市中央区市場町1番1号
(22) 出願日	平成10年(1998)5月29日	(72) 発明者	藤家 梓 千葉県長生郡睦沢町上市場256-3
		(72) 発明者	丸 論 千葉県千葉市緑区土気町646-5
		(72) 発明者	長谷川 誠 千葉県千葉市緑区椎名崎町486 コーブシ ティおゆみ野E-503
		(72) 発明者	横山 とも子 千葉県千葉市美浜区磯部5-16-1-501
		(74) 代理人	弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 新規微生物及びそれを用いたコガネムシ科昆虫の防除方法

(57) 【要約】

【課題】 ドウガネブイブイをはじめとするコガネムシ科幼虫の防除に有効な微生物、及びその胞子を用いたコガネムシ科幼虫の防除方法及び微生物製剤を提供する。

【解決手段】 バチルス・ボビリエ・セマダラ株の菌体、好ましくは胞子、又は該胞子を含む組成物をドウガネブイブイをはじめとするコガネムシ科幼虫に摂取させ、該微生物を感染させることによって、コガネムシ科幼虫を防除する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 セマダラコガネ及びドウガネブイブイに殺虫性を示すことを特徴とするバチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*) に属する微生物。

【請求項2】 バチルス・ポピリエ・セマダラ株 (*Bacillus popilliae semadara*) (FERM P-16818) である請求項1記載の微生物。

【請求項3】 請求項1記載の微生物をコガネムシ科昆虫に作用させることを特徴とするコガネムシ科昆虫の防除方法。

【請求項4】 請求項1記載の微生物の胞子をコガネムシ科昆虫に作用させることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】 コガネムシ科昆虫がドウガネブイブイ昆虫であることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項6】 コガネムシ科昆虫を防除するための微生物製剤であって、請求項1記載の微生物の胞子を含む微生物製剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バチルス・ポピリエに属する新規微生物、その胞子を用いたコガネムシ科昆虫の防除方法および微生物製剤に関する。前記微生物は、植物害虫であるコガネムシ科幼虫に対して乳化病を誘発することができるので、コガネムシ科昆虫に対する微生物農薬として利用することができる。

## 【0002】

【従来の技術】従来、芝地、牧草地、農地、果樹園、庭園などにおいて植物害虫となっているコガネムシ科昆虫に対して、その防除には化学合成された農薬を用いることが一般的であった。しかし、環境問題が重要視される時代背景下、自然環境や人体への悪影響が懸念される化学農薬に代わって、環境保全に貢献することのできる安全性の高い生物的防除法が切望されている。

【0003】上記のような観点から、昆虫に対して殺虫性を有する微生物を用いた微生物農薬が開発されており、例えば、鱗翅目や蚊の幼虫に対して病原性を有するバチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) の生菌又はその殺虫成分を農薬とするいわゆるBT剤は代表的なものとして知られている。

【0004】コガネムシ科昆虫についても、乳化病に冒されたマメコガネ (*Popillia japonica*) 幼虫から単離されたバチルス・ポピリエに属する微生物が、マメコガネ幼虫に対して乳化病を誘発することが知られており、既に、米国においては該微生物を用いた微生物製剤が市販されている。しかしながら、該微生物は日本で重要害虫となっているドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*) に対しては効果がない (農業有用微生物—その利用と展望—梅谷献二、加藤鑑 236頁 1990年) ため、我が国においてコガネムシ科幼虫防除剤として使用する

には満足できるものではなかった。

【0005】ドウガネブイブイに対して殺虫性を有するバチルス属細菌としては、バチルス・チューリンゲンシスに属する微生物 (バチルス・チューリンゲンシス・バー・ジャボネンシスN141株、特開平8-228783号公報) が知られているが、バチルス・ポピリエに属する微生物では知られていない。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記観点からなされたものであり、ドウガネブイブイをはじめとするコガネムシ科昆虫の防除に有効な微生物、及びその胞子を用いたコガネムシ科昆虫の防除方法及び微生物製剤を提供することを課題とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ドウガネブイブイやセマダラコガネ (*Blitopertha orientalis*) の幼虫に対する強い殺虫活性を有するバチルス・ポピリエに属する新規な微生物を見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明は、(1)セマダラコガネ及びドウガネブイブイに殺虫性を示すことを特徴とするバチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*) に属する微生物、(2)バチルス・ポピリエ・セマダラ (*Bacillus popilliae semadara*) 株 (FERM P-16818) である(1)に記載の微生物、(3)上記(1)に記載の微生物をコガネムシ科昆虫に作用させることを特徴とするコガネムシ科昆虫の防除方法、(4)上記

(1)に記載の微生物の胞子をコガネムシ科昆虫に作用させることを特徴とする(3)に記載の方法。(5)コガネムシ科昆虫がドウガネブイブイ昆虫であることを特徴とする(3)に記載の方法。(6)コガネムシ科昆虫を防除するための微生物製剤であって、(1)に記載の微生物の胞子を含む微生物製剤、に関するものである。

【0009】本発明において、「コガネムシ科昆虫の防除」とは、コガネムシ科昆虫、特にコガネムシ科幼虫の駆除、及びコガネムシ科幼虫による植物害虫の予防及び改善をいう。

## 【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

## 【0011】&lt;1&gt;本発明の微生物

本発明の微生物は、セマダラコガネ及びドウガネブイブイに殺虫性を示すことを特徴とするバチルス・ポピリエに属する微生物である。該微生物として具体的には、バチルス・ポピリエ・セマダラ株が挙げられる。バチルス・ポピリエ・セマダラ株は、千葉県千葉市において乳化病に冒されたセマダラコガネ幼虫から、後記実施例に示すようにして単離された株である。バチルス・ポピリエ・セマダラ株は、平成10年5月21日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305

日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERM P-16818の受託番号で寄託されている。

【0012】本発明のバチルス・ポビリエ・セマダラ株の細菌学的性質を表1に示す。この細菌学的性質、特に40℃までの温度条件下で生育できる点、及びセマダラコガネに対し乳化病を誘発するという病原性から、本菌株はバチルス・ポビリエに属することを認めた。さらに、本菌株の病原スペクトルを調べたところ、ドウガネブイブイ幼虫に対しても殺虫効果を有することが認められ、従来公知のいずれのバチルス・ポビリエとも異なる新規な微生物であることが判明した。そこで、本菌株をバチルス・ポビリエ・セマダラ株と命名した。

【0013】＜2＞本発明のコガネムシ科昆虫の防除方法及び微生物製剤

本発明の微生物をコガネムシ科昆虫に作用させることにより、コガネムシ科昆虫を防除することができる。本発明の微生物をコガネムシ科昆虫に作用させることは、本発明の微生物の菌体又は孢子、好ましくは孢子を、コガネムシ科昆虫、好ましくは幼虫の体内に取り込ませることにより行われる。

【0014】本発明の方法は、コガネムシ科に属する昆虫に広く適用し得るが、特にセマダラコガネ及びドウガネブイブイに対して好適に適用することができる。コガネムシ科昆虫体内に取り込ませるのは、本発明の微生物の菌体であってもよく、本発明の微生物が形成する孢子であってもよいが、孢子が好ましい。孢子は、例えば、次に示すようにして調製することができる。コガネムシ科幼虫、好ましくはセマダラコガネ幼虫あるいはドウガネブイブイ幼虫に本発明の微生物を取り込ませる。具体的には、本発明の微生物を前記幼虫の存在する飼育培土などに散布し、経口的に摂取させるか、又は、体液中に注射することにより注入する。この幼虫を好ましくは3週間～4週間飼育し、該幼虫体内で本発明の微生物を増殖させる。幼虫体内で増やした孢子は、例えば、幼虫を切開あるいは穴をあけるなどして体液を採取し、得られた体液を例えば遠心分離又は濾過することによって、得ることができる。

【0015】本発明の方法において、孢子は、そのまま用いてもよく、あるいは必要に応じて水あるいは中性の緩衝液、例えばPBS緩衝液(NaCl 8g、KCl 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g/1L、pH7.4)、リン酸緩衝液、又はTris-HCl緩衝液、好ましくはPBS緩衝液で洗浄してもよい。更に、孢子は、乾燥して粉末にしてもよいし、水あるいは上記緩衝液の懸濁液としてもよい。また、孢子は、微生物農薬等の微生物製剤に製造に通常用\*

\*いられる担体、栄養剤等の成分と混合し、得られる組成物を微生物製剤として使用することもできる。さらに、この組成物にバチルス・チューリンゲンシスの菌体又はその殺虫成分を混合することによって、本発明の微生物と併用してもよく、コガネムシ科幼虫に対してこれらの相乗作用が期待される。

【0016】本発明の微生物、孢子又は微生物製剤は、コガネムシ科幼虫を防除しようとする芝地、果樹園、農地などに土壌1m<sup>2</sup>当たり孢子数が1×10<sup>6</sup>個から1×10<sup>14</sup>個、好ましくは1×10<sup>9</sup>個から1×10<sup>13</sup>個となるように散布して行う。その後、必要に応じて1m<sup>2</sup>当たり1Lから2Lの散水し、及び/あるいは土壌を鋤こみ混和してもよい。懸濁液を用いる場合は、水あるいは前記中性緩衝液で1×10<sup>6</sup>個/Lから1×10<sup>14</sup>個/L、好ましくは1×10<sup>9</sup>個/Lから1×10<sup>13</sup>個/Lとなるように懸濁したものをを用いることが好ましい。

【0017】

【実施例】以下、本発明の実施例によりさらに具体的に説明する。

【0018】

【実施例1】バチルス・ポビリエ・セマダラ株の単離・同定

千葉県千葉市に所在する千葉県農業試験場芝草試験園場において1997年の夏、セマダラコガネ幼虫が大発生した。高密度となった該幼虫個体群の中には、体が乳白色に変化しているものが多数発見され、そのほとんどが2週間以内に死亡するという現象が観察された。この乳化病に冒されたセマダラコガネ幼虫から以下に示す方法で病原菌株を単離した。即ち、乳白色になり死亡した幼虫に注射針で穴をあけ、血体液から乳白色の体液を回収した。

【0019】上記体液から遠心分離により沈殿画分を採取した。顕微鏡観察により、この画分には、細菌の孢子が含まれていると推定された。この画分を60℃で15分間熱処理した後、MYPGPプレート(ミュラー-ヒントンプロス(Mueller-Hinton broth)10g、酵母エキス10g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3g、C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na 1g、グルコース0.5g、寒天20g/1L)に繰り広げ、30℃で、嫌気状態で7日間培養した。培地上に形成したコロニーを分離し、再び前記と同様にして培養する操作を繰返すことにより純粋菌株を分離した。上記のようにして分離された菌株の細菌学的性質を調べた結果を表1に示す。

【0020】

【表1】

表1バチルス・ポビリエ・セマダラ株の菌学的性質

グラム染色<sup>1)</sup> 陰性

形態的性質<sup>1)</sup> 長さ: 2.5~7.5 $\mu$ m、幅: 0.5~1.0 $\mu$ mの桿菌  
運動性: あり

生理的性質 嫌気性: +  
生育温度<sup>3)</sup>: 20~40℃  
0.001%のリゾチーム存在下での生育<sup>2)</sup>: +  
3%NaCl存在下での生育<sup>2)</sup>: -  
Sabouraudデキストロース培地での生育<sup>3)</sup>: -  
カタラーゼ産生<sup>1)</sup>: -  
Voges-Proskauer反応<sup>1)</sup>: -  
酸の生成<sup>3)</sup>:  
炭素源がグルコースの場合は酸を生成する  
炭素源がアラビノース、キシロース又はマンニ  
トールの場合には酸を生成しない  
孢子形成: +

1): 栄養細胞をMYPGP培地上で30℃、5日間培養

2): 栄養細胞をMYPGP培地上で30℃、7日間培養

3): 栄養細胞をMYPGP培地上で30℃、10日間培養

【0021】表1に示す細菌学的性質から、本菌株はバチルス・ポビリエに属することを認めた。バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) に記載されているバチルス・ポビリエの菌学的性質によれば、形態的性質は長さ: 1.3~5.2 $\mu$ m、幅: 0.5~0.8 $\mu$ mの桿菌であり、生育温度が20~35℃である点以外は、表1と一致する。尚、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジーには、3%NaCl存在下での生育については記載されていない。一方、実施例3及び実施例4に示すように、上記菌株はセマダラコガネやドウガネブイなどのコガネムシ科幼虫に対し乳化病を誘発するという病原性を有していた。ドウガネブイ幼虫に対しても殺虫効果を有する点で、本菌株は従来公知のいずれのバチルス・ポビリエとは異なる新規な微生物であり、バチルス・ポビリエ・セマダラ株と命名した。

【0022】

【実施例2】バチルス・ポビリエ・セマダラ株の孢子画分の製造

腐葉土と砂を3:1の割合で混合した飼育培土を直径6cmのプラスチックカップに20gを入れ、乳化病に感染していた幼虫から採取した孢子を $1 \times 10^3$ 個程度散布した。セマダラコガネ3令幼虫をカップに入れ、25℃で飼育した。幼虫の体が乳白色を帯びてきた時点で体表面を1%次亜塩素酸ナトリウム液で殺菌し、注射針で穴を明け体液を採取した。該体液から10000rpm、\*

20\*5分間の遠心分離により孢子を回収した。孢子をPBS緩衝液で2回洗浄し、 $1 \times 10^3$ 個/mlとなるように調整し、孢子画分とした。

【0023】寄託菌株から孢子を調製する際は、幼虫の体液中に注射により栄養細胞を1頭当たり約100個程度注入し、30℃で2週間~4週間飼育し、乳白色になった幼虫の体表面に穴を明け体液を採取すればよい。

【0024】

【実施例3】本発明の微生物のセマダラコガネ幼虫に対する殺虫活性

腐葉土と砂を3:1の割合で混合した飼育培土を直径6cmのプラスチックカップ20個に各20gずつ入れ、孢子数が $1 \times 10^7$ 個となるように実施例2で得た孢子画分を散布した。同様に孢子数が $1 \times 10^7$ 個となるようなカップも20個用意した。それぞれのカップにセマダラコガネ3令幼虫を1頭ずつ、更にサツマイモ小片を1つずつ入れ、25℃で40日間飼育しながら死亡個体数を調べた。また、死亡幼虫体内に孢子が形成されているかどうか体液を顕微鏡で調べた。

【0025】結果を表2に示す。孢子を $1 \times 10^7$ 個/カップ散布した区では、30日目以降40%の幼虫の死亡が確認された。 $1 \times 10^8$ 個/カップ散布した区においては散布後14日目から乳白色になった個体が観察され、散布後30日目で100%の幼虫が死亡し、60%が体内に孢子を形成していた。

【0026】

【表2】

表2 セマダラコガネ幼虫に対する殺虫活性

死亡率 (%)	
孢子散布量	

7 (個)	10日目	20日目	30日目	40日目
0	0	10	10	10
$1 \times 10^7$	10	30	40	40
$1 \times 10^8$	20	80	100	100

【0027】

【実施例4】本発明の微生物のドウガネブイブイ幼虫に対する殺虫活性  
ドウガネブイブイの2令幼虫を用い、実施例3と同様の方法で行った。ただし、飼育培土として腐葉土と火山灰土を1:1の割合で混合したものを使用した。

【0028】結果を表3に示す。胞子を $1 \times 10^7$ 個/

\*カップ散布した区では、30日目以降15%の幼虫の死亡が確認された。 $1 \times 10^8$ 個/カップ散布した区においては散布後18日目から乳白色になった個体が観察され、散布後40日目で95%の幼虫が死亡し、55%が体内に胞子を形成していた。

【0029】

【表3】

表3 ドウガネブイブイ幼虫に対する殺虫活性

胞子散布量 (個)	死亡率(%)			
	10日目	20日目	30日目	40日目
0	0	0	5	5
$1 \times 10^7$	5	10	15	15
$1 \times 10^8$	25	30	75	95

【0030】

【実施例5】ドウガネブイブイ幼虫防除による芝被害の軽減

芝を生やした面積約500cm<sup>2</sup>のポットを用意し、その土中にドウガネブイブイ2令幼虫を1ポット当たり10頭ずつ埋めた。該ポットに、実施例2で得た胞子を $1.25 \times 10^{10}$ 個/m<sup>2</sup>あるいは $1.25 \times 10^{11}$ 個

※/m<sup>2</sup>となるように散布した。また、胞子を散布しない区も対照として設けた。それぞれの区における芝の被害度を30日間にわたって観察した。試験は各区4連で行い、被害度を平均値で表4に示した。

【0031】

【表4】

表4 芝の被害度

胞子散布量 (個/m <sup>2</sup> )	被害度		被害度
	15日目	30日目	
0	4.0	4.0	0:無し
$1.25 \times 10^{10}$	3.8	2.8	1:軽度
$1.25 \times 10^{11}$	2.5	1.0	2:中程度
			3:重度
			4:甚大

【0032】

【発明の効果】本発明の微生物は、コガネムシ科幼虫に対し致死性の乳化病を誘発するため、菌体、特に胞子を幼虫に作用させることによってコガネムシ科幼虫を防除し、芝、牧草、果樹、農園芸植物などを該害虫の被害から保護することができる。特に本微生物は、バチルス・ボビリエに属する微生物としては、日本で重要害虫とな★

★っているドウガネブイブイの幼虫に対しても殺虫作用を有することが示された初めての菌株であり、よって我が国におけるその使用効果は非常に大きい。その上、自然環境への悪影響や人体への毒性はほとんどなく、本発明の防除方法は地球環境保全にも貢献する優れた防除方法である。

( 6 )

特開平 1 1 - 3 3 2 5 5 6

フロントページの続き

( 51 ) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F 1

C 1 2 R 1 : 07 )